



Desenvolvimento de Técnicas Imunológicas Aplicadas na Detecção Específica de Fungos Micorrízicos Arbusculares



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. de Pesq. e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº61

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

**Desenvolvimento de Técnicas Imunológicas Aplicadas na
Detecção Específica de Fungos Micorrízicos Arbusculares**

Francisco Adriano de Souza
Simão Lindoso de Souza
Verônica Massena Reis

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa *Agrobiologia*
Caixa Postal 74505
23851-970 - Seropédica – RJ
Telefone: (021) 682-1500
Fax: (021) 682-1230
e-mail: adc@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor: Sebastião Manhães Souto

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix
Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

SOUZA, F.A. de; SOUZA, S.L.; REIS, V.M. **Desenvolvimento de Técnicas Imunológicas Aplicadas na Detecção Específica de Fungos Micorrízicos Arbusculares.** Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. 1998. 8p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 61).

ISSN 0104-6187

1. Micorriza. 2. Fungo. I. Souza, S.L. de, colab. II. Reis, V.M., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 589.2

S U M Á R I O

1. RESUMO	4
2. RESULTADOS PARCIAIS	5
3. ALTERAÇÕES NA FORMULAÇÃO	8

Desenvolvimento de Técnicas Imunológicas Aplicadas na Detecção Específica de Fungos Micorrízicos Arbusculares¹

Francisco Adriano de Souza²
Simão Lindoso de Souza³
Verônica Massena Reis²

1. Resumo

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem contribuir para o desenvolvimento e produção de plantas e para a economia de insumos, notadamente o fósforo. No entanto o trabalho com FMAs a nível de campo é dificultado pela falta de metodologias adequadas ao seu estudo, as quais não permitem a identificação de espécies introduzidas em uma comunidade complexa. Técnicas de imunologia permitem a detecção e identificação de um organismo específico ou de um grupo de organismos sem que seja necessário cultivo destes organismos em meios de cultivo. Este subprojeto tem por objetivo desenvolver e adaptar técnicas sorologia para a detecção de FMAs, a fim de empregá-las em estudos de ecologia e manejo destes simbiontes. Na primeira fase do trabalho foi desenvolvido soro policlonal a partir da parede de esporos de três espécies (*Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e *Scutellospora heterogama*). Estes soros quando testados em ELISA indireto não apresentaram boa reatividade. Na segunda fase, optou-se pela imunização dos animais a partir de extratos de proteínas solúveis originárias de esporos, sendo desenvolvido soro policlonal a partir de proteínas solúveis de esporos de *Gigaspora margarita*. O soro foi testado quanto título (Bruto e purificado com Proteína A) e reação cruzada. A especificidade do anticorpo foi determinada através do teste de reação cruzada contra esporos de outros FMAs tais como: *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *Scutellospora gregaria* e *S. heterogama*, sendo que *S. gregaria* apresentou certa reação por ser da mesma família da *G. margarita*. O anticorpo também foi aplicado contra esporos de *Gigaspora margarita*, além de micélio e raízes transformadas e colonizadas pelo mesmo fungo. O anticorpo apresentou reações imunológicas elevadas contra os esporos, decrescendo respectivamente, para micélio e raízes colonizadas, na concentração de 5,0 e 2,5 mg de raízes/50µl de solução. Estes resultados representam 50% do proposto para o atingimento da meta. A obtenção do segundo soro proposto está atrasada, ele será obtido a

¹ Trabalho se refere ao relatório anual (1997) do subprojeto 03.0.96.123-03 com o mesmo título.

² Pesquisador da Embrapa Agrobiologia

³ Estudante de Graduação da UFRRJ

partir de proteínas solúveis de esporos de *Glomus clarum*, porém ainda esta na fase da imunização dos animais. Os resultados apresentados mostram, através do método de ELISA indireto a possibilidade de produzir um anticorpo policlonal espécie-específico a partir de proteínas solúveis extraídas de esporos do FMA *Gigaspora margarita*. A detecção de material de raízes colonizadas pelo fungo possibilitará o cumprimento da meta 02, prevista para o próximo ano. Esta consiste na avaliação da colonização radicular através de ELISA indireto. A meta 03, que consiste na otimização da técnica do imuno-ouro para o estudo da ontogenia e competitividade entre espécies de FMAs a partir dos soros policlonais obtidos, também prevista para o próximo ano poderá ser executada com o soro obtido.

2. Resultados Parciais

Na primeira fase do trabalho foi desenvolvido soro policlonal a partir da parede de esporos de três espécies (*Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e *Scutellospora heterogama*). Estes soros quando testados em ELISA indireto não apresentaram boa reatividade.

Na segunda fase, optou-se pela imunização dos animais a partir de extratos de proteínas solúveis originárias de esporos. Assim, foi desenvolvido soro policlonal a partir de proteínas solúveis de esporos de *Gigaspora margarita*. O soro sem purificação (bruto) apresentou reações imunológicas até a diluição do antígeno de 1:3000 vezes, sendo que o ótimo ficou na faixa de 1:500 vezes (Figura 1). Após a purificação através da passagem do soro bruto por coluna preenchida com Proteína "A" (Merk), ocorrem perdas de imunoglobulinas não específicas (IgM principalmente) diminuindo as reações imunológicas mas ganhando em especificidade. Após este tratamento, o título máximo ficou em torno da diluição de 1:1000, sendo o ótimo a diluição 1:100 vezes.

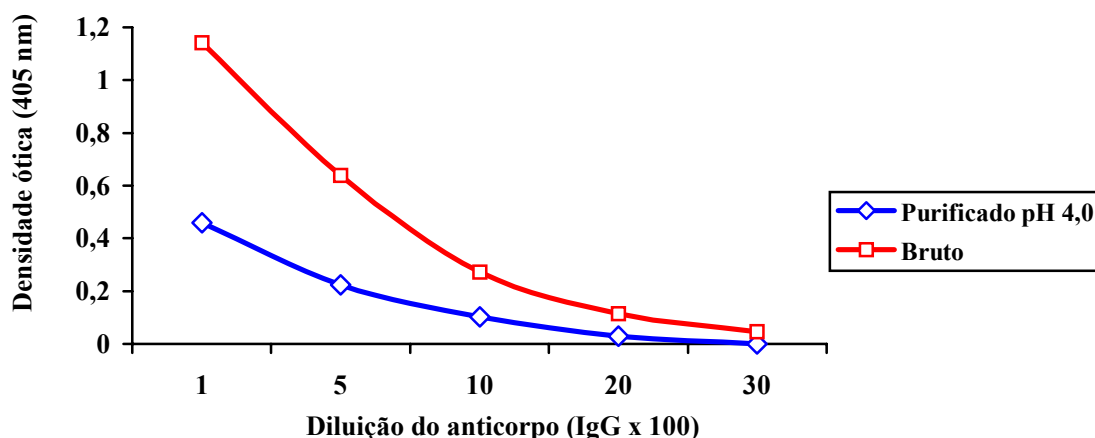


Figura 1. Título do soro produzido contra o FMA *Gigaspora margarita*. Diluição do conjugado 1:300 com tempo de incubação de 45 min. A leitura da placa foi feita a 405 nm. com 30 esporos por poço.

A especificidade do anticorpo foi determinada através do teste de reação cruzada contra esporos de outros FMAs tais como: *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *Scutellospora gregaria* e *S. heterogama*, sendo que *S. gregaria* apresentou certa reação por ser da mesma família de *G. margarita* (Tabela 1). Outros FMA nativos ou mesmo outros componentes da microbiota serão testados visando quantificar as reações cruzadas em amostras naturais (plantas e solo).

Tabela 1. Teste preliminar de quantificação de reações cruzadas entre outras espécies de FMAs extraídos de vasos de cultivo. As leituras da placa foram feitas a 405 nm.

ESPÉCIE FMA	Nº de esporos/poço	Anticorpo Bruto
<i>Gigaspora margarita</i>	30	1,320
<i>Glomus clarum</i>	30	0,027
	60	0,015
<i>Glomus etunicatum</i>	30	0,012
	60	0,031
<i>Scutellospora gregaria</i>	30	0,124
<i>Scutellospora heterogama</i>	30	0,062

O anticorpo também foi aplicado contra esporos de *Gigaspora margarita*, além de micélio e raízes transformadas e colonizadas pelo mesmo fungo (Tabela 2). O anticorpo

apresentou reações imunológicas elevadas contra os esporos, decrescendo respectivamente, para micélio e raízes colonizadas, na concentração de 5,0 e 2,5 mg de raízes/50µl de solução.

Tabela 2. Sensibilidade do método de ELISA indireto contra estruturas do FMA e raízes transformadas de cenoura, colonizadas ou não com o FMA *Gigaspora margarita*. As leituras da placa foram feitas a 405 nm.

Material	Quantidade/poço	Leituras
Esporos	30 esporos	0,835
Micélio	*	0,174
Raízes colonizadas	2,5 mg	0,154
	5,0 mg	0,148
Raízes não colonizadas	2,5 mg	0,069
	5,0 mg	0,086

(*) Quantidade de micélio não determinada.

Estes resultados representam 50% do proposto para o atingimento da meta. A obtenção do segundo soro proposto esta atrasada, ele será obtido a partir de proteínas solúveis de esporos de *Glomus clarum*, porém ainda esta na fase da imunização dos animais. O atraso deu devido a grande quantidade de esporos necessários para extração do teor de proteína necessário à imunização dos coelhos. O teor de proteína mínimo necessário em cada imunização para coelhos Nova Zelândia deve estar na faixa de 50 a 1000 mg. Neste sentido foram extraídos e separados manualmente mais de 50.000 esporos, estes foram liofilizados e o peso seco determinado. Após extração de proteínas solúveis o extrato obtido foi homogeneizado e em seguida alicotado e armazenado a -20°C. O extrato apresentou 37 mg.ml⁻¹ de proteína, determinado através do método do BRADFORD.

Os resultados apresentados mostram, através do método de ELISA indireto a possibilidade de produzir um anticorpo policlonal espécie-específico a partir de proteínas solúveis extraídas de esporos do FMA *Gigaspora margarita*. A detecção de material de raízes colonizadas pelo fungo possibilitará o cumprimento da meta 02, prevista para o próximo ano. Esta consiste na avaliação da colonização radicular através de ELISA indireto. A meta 03, que consiste na otimização da técnica do imuno-ouro para o estudo da ontogenia e competitividade entre espécies de FMAs a partir dos soros policlonais obtidos, também prevista para o próximo ano poderá ser executada com o soro obtido.

3. Alterações na Formulação

Será feita a caracterização dos antígenos utilizados na imunização dos animais. O extrato bruto de proteína solúvel obtido a partir dos esporos serão utilizados para obtenção de gel de poliacrilamida e posteriormente incubado com o soro a fim de se conhecer as proteínas imunogênicas (DOT-BLOT). Este trabalho será desenvolvido com os fungos *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*.

A fim de atender a meta 02 e a 03, será conduzido em condições de casa-de-vegetação um experimento envolvendo os fungos *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*, a fim de se quantificar a colonização radicular a através de ELISA indireto e a presença de estruturas do fungo através da técnica do imuno-ouro. O delineamento experimental será o de blocos casualizados com quatro repetições em esquema fatorial. Os fatores serão fungo (04 níveis: controle, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e mistura dos fungos), doses de fósforo (02 níveis: baixo e alto), planta hospedeira (sorgo e batata-doce) e duas épocas de avaliação, perfazendo um total de 128 parcelas experimentais (vasos).